

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭56-79957

⑤ Int. Cl.³
G 01 N 33/54

識別記号
厅内整理番号
7906-2G

⑬ 公開 昭和56年(1981)6月30日
発明の数 2
審査請求 未請求

(全4頁)

⑭ エルシニア・エンテロコリティカ多糖体感作
血球およびこれを用いるエルシニア・エンテ
ロコリティカ多糖体抗体の検出方法

⑮ 特 願 昭54-157909
⑯ 出 願 昭54(1979)12月5日
⑰ 発明者 富山哲雄

東京都練馬区大泉学園町163-
2

⑮ 出願人 株式会社相互生物医学研究所
東京都中野区中央4丁目25番10
号

⑯ 代理人 弁理士 若田勝一

明細書

1. 発明の名称

エルシニア・エンテロコリティカ多糖体感作
血球およびこれを用いるエルシニア・エンテ
ロコリティカ多糖体抗体の検出方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 固定赤血球にカップリング剤を介してエルシニア・エンテロコリティカ多糖体を結合させて成るエルシニア・エンテロコリティカ多糖体感作血球。
- (2) カップリング剤がタンニン酸である特許請求の範囲1項記載のエルシニア・エンテロコリティカ多糖体感作血球。
- (3) 固定赤血球にカップリング剤を介してエルシニア・エンテロコリティカ多糖体を結合させてなる感作血球をヒトの体液もしくはその培養液と接触させ、マイクロタイマー法によつて吸収像を観察することを特徴とするエルシニア・エンテロコリティカ多糖体抗体の検出方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、赤血球にカップリング剤を介してエルシニア・エンテロコリティカ多糖体を結合させて成るエルシニア感作血球吸収反応用感作血球およびこれを用いるエルシニア・エンテロコリティカ多糖体抗体の検出方法に関するものである。

エルシニア・エンテロコリティカ (*Yersinia enterocolitica* , 以下エルシニアと略記する) は腸内細菌に属するグラム陰性の桿菌で、ヒトに感染して、終末回腸炎、虫垂炎、結節性紅斑、関節炎、敗血症をはじめ、母には肝臓炎、腎臓炎、骨髄炎などを起こす。本菌の感染症すなわち、エルシニア症の病型は広範囲且つ極めて多彩であり、特有の臨床所見を示さない疾患である。従つて、エルシニア症を診断するには、エルシニアの分離又は血清学的検査法にたよらなければならない。このうち、細菌の分離は急性期の化学薬剤前に行なわないとほとんど分離することができないこと、又、本菌が好冷細菌

であり且つ発育の遅い細胞である為に、必ずしも高等に検出されていない。又、血清反応としては、加熱又はホルマリン死滅を用いる細胞膜反応が多く用いられているが、この方法は感度が十分でない点の他に、エルシニア菌の有する細胞内細胞共通抗原に対する抗体によつても感度がおこる為、特異性において劣る欠点があつた。

しかし、本法の多糖体は型特異的であつて、他の細胞と交叉することのない特異抗原であることがよく知られているので、エルシニア抗体測定の為に感作血球であると云える。

本発明者は上記した従来のエルシニア症診断法における欠点を克服すべく総意研究を行なつた結果、赤血球にカップリング剤を介してエルシニア型特異抗原である多糖体を結合させた感作血球を行い、受身血球凝集反応により、高感度でしかも特異的にエルシニア症を確別診断することが可能であることを見出し本発明を完成するに至つた。

(3)

も高い抗体価がえられる。これらの各抗原の調製法はすでによく知られている通りである。すなわち、Bolvin 抗原は、細胞を水浴下でトリクロール酢酸で処理し、遠心上清のエタノール沈殿として得られる。沈殿質は細胞から約 70°C でエタノール抽出し、遠心して、その水層より精製できる。アルカリ多糖は 0.25N のカセイソーダ中で多糖体を抽出し、更に、エタノール沈殿、アセトン沈殿などによつて精製される。この他、EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid, sodium salt) によつても抽出される。

これらの多糖体はいずれもエルシニアの血清型特異性を示し、他の細胞との共通抗原性を示さず、しかも固定赤血球によく感作することができる。

本発明の感作血球を調査するには次の様に行なう。すなわち、カップリング剤を用いて赤血球を処理し、カップリング剤処理血球（赤血球表面にカップリング剤が結合した赤血球）を保つてこれにエルシニア多糖体を含む液を接触させて

本発明の目的は、オ1に赤血球にカップリング剤を介してエルシニア多糖体を結合して成るエルシニア症診断用感作血球を提供することであり、オ2にこれを用いたエルシニア多糖体抗体の検出方法を提供することである。

本発明の感作血球に用いる赤血球は固定赤血球であるが、これに用いる赤血球はヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、モルモット、ニワトリ、七面鳥、ヒトなどから従来の方法に従つて得られる。固定赤血球は例えば次の様にして調製される。すなわち、アルセバー (Alsever) 液に懸濁させた生赤血球を一酸化炭素ガスで処理し、この赤血球にホルマリンを加えて固定を行なう。カップリング剤としてはタンニン液、グルタルアルデヒド、塩化クロムなどが使用できるが、中でもタンニン液が好ましい。

赤血球に感作するエルシニア多糖体はボルビン抗原 (Bolvin Antigen) 、唾液質、アルカリ多糖体のいずれでもよく、どの抗原もエルシニアの血清型特異的抗原であるがアルカリ多糖は遠

(4)

エルシニア多糖体感作血球を得る。かくして得られた本発明の感作血球を長期に亘つて保存するには感作血球を保存液中に懸濁させて保存してもよく、あるいは保藏液を含む瓶と共に凍結乾燥して、凍結乾燥品として保存してもよい。凍結乾燥品の場合は使用に際しては感作血球に希釈液を加えて検断液を調製する。

赤血球をカップリング剤で処理することなく抗原と接触させた場合には赤血球に抗原が結合しないこと、本発明の感作血球がエルシニア抗体に対し特異的に反応して血球凝集を経ずが、末感作血球は反応しないことからも本発明の感作血球は赤血球にカップリング剤を介してエルシニア多糖体が結合したものであると言える。

本発明の感作血球を用いたエルシニア症の診断は、本発明の感作血球序凝集をヒトの血清もしくはその希釈液と接触させ受身血球凝集反応に基づく質膜凝集を調査することにより行なうが、手法としてはマイクロタイマー法によるのが最も好ましく、本発明の感作血球を用いた

マイクロタイマーによれば、(1) 手技が極めて簡単であり；(2) カスク1～2時間で抗体が可能；(3) 感度が高いという利点がある。 すなわち本発明は、従来エルシニア症の診断に用いられたことのない固定赤血球による受身赤血球濃度応用感作血球およびその製造法を提供し、本発明の感作血球を用いた診断法によつてエルシニア多糖体抗体の検出を高感度迅速にし、患者の診断を容易にしたのはもちろんのこと引いては、ヒトの抗体測定によるエルシニア症の流行状況など公衆衛生上、医学上の診断に応えることができる他煩雑切れの輸血用血液から特異的血清法用のガムマーダロプリン製剤を調製する時の抗体スクリーニングにも有用である。エルシニア多糖体を固定赤血球に感作した時は文法未報であり、これを用いる受身赤血球感作反応は全く新規なものである。以下、実施例を示して本発明をさらに詳しく説明する。

(A) 抗原の調製

1) ポアパン抗原の調製

(A)

3) アルカリ多糖の調製

10%の乾燥菌体を200mLの0.25N NaOHに懸濁し、66°C 5時間抽出した後遠心して上清を採り、冷却後エチルアルコール25容を加え、一夜氷室において後遠心して沈澱を濾め、アセトン洗浄をした後乾燥し、これを0.25Nトリクロール酢酸に懸濁し、氷室に3時間保つた後遠心して上清をとり、pHを中性とした後、エタノール沈殿、およびフエノール抽出を行なつてアルカリ多糖をえた。

(B) 固定赤血球の調製

エウトリから得られた新鮮血液にアルセバーア (Alsever) 液を等量加え、フラスコ中で都市ガス (COガス含有) を30分間ふき込んだ後直ちに固定液 (5%のクエン酸ソーダを加えた生理食塩水 + 37% ホルマリン (容積比29:1)) を等量加え、37°Cの定温器中で24時間放置するが、この間時々振とう

特開昭56-79957(3)

ミュラーーヒントン寒天 (Mueller-Hinton Agar) で30°C 4日間培養したエルシニア・エンテロコリティカ3型菌の菌体を濾めて生理食塩水で3回洗浄し、100°C 30分 加熱した後、滅菌で乾燥し、固体を得た。この菌体を氷冷した0.25Nのトリクロール酢酸に懸濁し、3時間氷冷し乍ら抽出し、遠心して上清を分取した。この上清にエチルアルコール2容を加え、一夜氷冷後沈澱を分取し、水に對して透析した後遠心して上清をポアパン抗原とした。

2) 細胞質の調製

乾燥菌体10%を70°C 液温水200mLに懸濁し、これに70°C加熱した90%フエノール200mLを加え、15分反応させた後、冷却し遠心して上層の水層を分取し、これを水に對し3日間透析した。2000 rpm 30分遠心した上清を30000 rpm 5時間遠心して沈澱をとり、細胞質を得た。

(B)

する。その後80°Cで5回、生理食塩水で5回洗浄する。ナトリウムアゲットを0.1%加えたpH7.2のリン酸緩衝食塩水に10%になるよう固定赤血球を懸濁させ氷室に保存する。この固定赤血球は1年以上安定であった。

(C) 感作血球の調製

前記(A)において得られた固定赤血球を2.5%含むリン酸緩衝食塩水 (pH7.8, 以下PBSと称す) K1 : 100000のタンニン液/PBSを等量加え、37°Cで15分間タンニン液処理を行なつた後、PBSで1回洗浄し、原量のPBSに懸濁させてタンニン血球液を調製した。このタンニン血球液に等量の、前記(B)において得られた抗原液を加え、37°Cで30分間処理した後、PBSで1回、pH7.2のPBSにBSA1%、NaN₃0.1%を加えた希釈液で1回洗浄し原量の半量の凍結乾燥品 (上記希釈液にグリシン0.5%, デキストラン (和光純薬, 分子量200000～300000) 0.7%を

(9)

-289-

(10)

加えたもの]に並置し複数乾燥する。
 本反応を従来の血球凝集反応と比較すると次の通りである。
 抗体はエルシニア症患者血清である。

反応	抗体価
受身血球凝集反応, ボアパン抗原	1:6400
達勝質	1:12800
アルカリ多糖	1:25600
対照(未感作)	1:40以下
両体凝集反応	1:800

上記のようにこの血球凝集反応は従来行なわれている血球凝集反応に比較して、ボアパン抗原で8倍、達勝質で16倍、アルカリ多糖で32倍の感度を示し、又、未感作の対照血球では完全な陰性を示した。

特許出願人 株式会社 相互生物学研究所

代理人弁理士 若田勝一

(11)

End of Result Set

 [Generate Collection](#) [Print](#)

LB: Entry 2 of 2

File: DWPI

Jun 30, 1981

DERWENT-ACC-NO: 1981-59741D
 DERWENT-WEEK: 198133
 COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: *Yersinia enterocolitica* polysaccharide-sensitised blood corpuscles - bonded with fixed erythrocytes via coupling agent, esp. tannic acid

PRIORITY-DATA: 1979JP-0157909 (December 5, 1979)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 56079957 A	June 30, 1981		004	

INT-CL (IPC): G01N 33/54

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 56079957A

BASIC-ABSTRACT:

Yersinia enterocolitica polysaccharide-sensitised blood-corpuscles where *Yersinia enterocolitica* polysaccharide is bonded with fixed erythrocytes via coupling agent. Coupling agent is pref. tannic acid but may also be glutaraldehyde or chromium chloride. *Yersinia enterocolitica* polysaccharide antibody may be detected by contacting sensitised blood-corpuscles where *Yersinia enterocolitica* polysaccharide is bonded with fixed erythrocytes via coupling agent to human humor or its diluted liquor and observing agglutination image by microtitration method.

Yersinia enterocolitica infects human being and causes various diseases such as ileitis terminalis, appendicitis, erythema nodosum, arthritis, septicemia, hepatic abscess, pulmonary abscess and osteomyelitis. *Yersinia* diseases may be differentiated and diagnosed at high sensitivity and specifically. Fixed erythrocytes may be produced e.g. as follows: Raw erythrocytes suspended in Alsever liquor are treated with carbon monoxide gas, formalin, is added into erythrocytes to fixtate. *Yersinia enterocolitica* polysaccharide sensitised to erythrocytes may be any one of Boivin Antigen, glycolipid or alkali polysaccharide and antigen of any one is specific antigen in serum form of *Yersinia* and alkali polysaccharide give most highest antibody value.

Those polysaccharides inhibits specificity to serum form of *Yersinia* and does not inhibit common antigenicity with other bacteria sensitised to fixed erythrocytes.

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office